

Lysosomal Disorders: Enzymatic Diagnosis in Dried Blood Spots on Filter Paper

김숙자, Danny M. Feuchuk, 전영미, 정재훈
청주 소아 병원/한국유전학연구소/KAIST *

서 론

리소좀은 세포의 재활용 장소로서 복합물질을 인체가 필요한 단순한 물질로 분해 시키는 세포 기관이다. 리소좀 축적 대사질환은 리소좀의 필요한 요소가 결핍되어 분해되지 않은 대사산물이 세포에 쌓이게 되고 시간이 지나면 세포의 축적된 대사물로 인해 세포의 부종이 오며 세포내의 공간을 차지하여 리소좀이 정상 기능을 할 수 없게 만든다. 리소좀 대사질환은 각 질환마다 결핍된 효소가 다르고 이 효소 결핍으로 인해 시간이 갈수록 육체와 외모의 변화가 오고 뇌기능에 영향을 준다¹⁻³⁾. 뇌조직과 다른 인체조직에 영구적인 변화가 오기 전에 조기 진단으로 치료하는 것이 특히 중요하다. 리소좀 질환의 유전자 재조합을 이용하여 생산된 효소치료가 가능하거나 곧 치료가 가능한 질환은 Fabry, Gaucher, Krabbe, Pompe, Niemann-Pick 등⁴⁻⁵⁾이다. 대부분의 리소좀 대사질환 진단은 소변으로 배출되는 대사산물을 측정하여 진단을 할 수 있으나 질병의 확진은 각 질환과 관련된 효소의 양을 측정하는 것이다. 한국유전학 연구소에서

진단 가능한 12가지 리소좀 대사질환 중에 3가지 질환을 가진 환자에서 백혈구와 건조된 혈액 여지에서 측정된 효소 결과를 비교하고, -Galactosidase (Fabry), -Iduronidase (Hurler), -Galactosidase (GM1), -Glucuronidase (Sly)에 대한 정상군에서의 농도를 측정하였다.

검사 대상과 방법

검사대상

MLD 환자 1례와 heterozygotes인 환자의 부모, 1례의 Sphingomyelinase 결핍 환자, 확진되어 효소 치료중인 Pompe disease 환자 1례와 heterozygotes인 환자의 부모, 1례의 Sandhoff 환자, 1례의 Hunter 환자, 그리고 1례의 Gaucher 환자를 대상으로 하였다. 대조군으로는 Fabry 대조군 = 30례, Hunter 대조군 = 12례, -galactosidase 대조군 = 15례, -glucuronidase 대조군 = 18례 등 질병이 없는 건강한 성인과 아동을 대상으로 하였고, 모든 환자와 정상인 사람으로부터 충분한 설명 후에 검사에 대한 동의를 얻었다.

검사 방법

혈액여지(Schleider and Schuell #903)에 혈액을 채취하여 실온에서 말린 다음 3mm punch를 하여 96-well microplates에 넣어 37도의 substrate-buffer solution에서 incubate시켰다. Chamoles^{4,6}에 의해 보고된 방법을 참고하여 효소에 의해 분리된 형광을 띄는 4-Methylumbelliferyl (4-MU)을 fluorometry로 알칼리 용액에서 정량검사를 시행하였다. 이 세 가지 질환에 대한 분석은 동시에 같은 환아로부터 채취된 백혈구, 건조혈액여지에서 측정하여 비교하였다. 또한, 정상 대조군으로부터 똑같이 DBS와 백혈구 분리를 하여 혈액채취 후 72시간 이내에 검사를 실시하였다. 이 방법이 산전검사로 이용된 경우는 부모, 환아, 그리고 태아로부터 분자생물학적인 방법으로 효소의 양과 돌연변이를 재확인하였다.

검사결과

결과 및 고찰

대조군에서 추출한 백혈구, 건조된 혈액 여지에서의 β -glucosidase (Gaucher) 효소 활성도는 각 11.5(5.8-17.2) pmoles/punch/hr, 17.7(12.7-24.3) pmoles/punch/hr 이었고 환아에서 측정된 효소 활성도는 백혈구에서는 1.0, 건조 혈액 여지에서는 검출되지 않았다(표1,2). 대조군에서 추출한 백혈구, 건조된 혈액 여지에서의 iduronate 2-culphatase (Hunter) 효소 활성도는 각 22.9 (15.3-27.5) pmoles/punch/hr, 3.1(2.0-4.3) pmoles/punch/hr 이었고, 환아에서 측정된 효소 활성도는 백혈구에서는 0.05 pmoles/punch/hr, 건조 혈액 여지에서는 0.29 pmoles/punch/hr이었다. 대조군에서 추출한 백혈구, 건조된 혈액 여지에서의 hexosaminidase A 효소 활성도는 각 209 (134-284) pmoles/punch/hr, 11.7(9.6-21.1) pmoles/punch/hr 이었고, 환아에서 측정된 효소 활성도는 백혈구에서는 16.9 pmoles/punch/hr, 건조 혈액 여

Table 1. Enzymatic activities in Leukocyte

Leukocyte Assay					
	n	Mean \pm SD	Range	Patient value	% of Normal
β -GLUCOSIDASE (GAUCHER)	10	11.5 \pm 2.8	5.8 \pm 17.2	1	8.7
IDURONATE 2-SULPHATASE (HUNTER)	8	22.9 \pm 4.9	13.1 \pm 32.7	0.05	0.2
HEXOSAMINIDASE A	8	209 \pm 37.4	134 - 284	16.9	8.1
HEXOSAMINIDASE B	8	1768 \pm 373.3	1022-2514	47	2.7

Assay results are expressed as:

Leukocyte: nmoles/mg protein/hour

Blood Spot: pmoles/punch/hour

Table 2. Enzymatic activities in dried blood spots on filter paper

	Blood spot Assay				
	n	Mean \pm SD	Range	Patient value	% of Normal
β -GLUCOSIDASE (GAUCHER)	10	17.7 \pm 3.6	12.7 - 24.3	0	0
IDURONATE 2-SULPHATASE (HUNTER)	7	3.1 \pm 0.8	2.0 - 4.3	0.29	9.4
HEXOSAMINIDASE A	8	11.7 \pm 4.2	9.6 - 21.1	1.8	15.3
HEXOSAMINIDASE B	8	70 \pm 23.7	61 - 122	3.9	5.6

Assay results are expressed as:

Leukocyte: nmoles/mg protein/hour

Blood Spot: pmoles/punch/hour

Table 3. Enzymatic activities in dried blood on filter paper

Enzyme	n	Mean \pm SD	Range
α -Galactosidase (Fabry)	30	9.7 \pm 2.2	5.2 - 14.2
α -Iduronidase (Hurler)	12	5.5 \pm 2.7	2.1-11.9
β -Galactosidase (GM1)	15	5.6 \pm 2.5	1.9-10.9
α -Glucuronidase (Sly)	18	35.5 \pm 16.2	22.3-68.2

지에서는 1.8 pmoles/punch/hr 이었다. 대조군에서 추출한 백혈구, 건조된 혈액 여지에서의 hexosaminidase B 효소 활성도는 각 1768 (1022-2514) pmoles/punch/hr, 70(61-122) pmoles/punch/hr 이었고, 환아에서 측정된 효소 활성도는 백혈구에서는 47 pmoles/punch/hr, 건조 혈액 여지에서는 3.9 pmoles/punch/hr 이었다. 각 환자들은 정상 대조군보다 백혈구와 건조된 혈액 여지에서 낮은 효소 활성도를 보였다.

정상인을 대상으로 각 α -Galactosidase (Fabry), α -Iduronidase (Hurler), β -Galactosidase (GM1), α -Glucuronidase (Sly)를 측정된 결과 각 9.7(5.1-13.8) pmoles/punch/hr, 5.5(2.1-11.9)

pmoles/punch/hr, 5.6(1.9-10.9) pmoles/punch/hr, 35.5(22.3-68.2) pmoles/punch/hr 이었다(표3).

건조 혈액 여지와 백혈구를 이용하여 정상군 및 환자군에서 결핍된 효소의 양을 측정할 수 있었다. 확진을 위해서는 피부 섬유아세포를 배양하거나 림프구를 분리하여 효소의 양을 측정해야 한다. Heterozygotes와 낮은 정상치의 효소 활성도를 가진 사람과의 구분이 어려운 경우가 있다. 본 연구에서는 리소좀 축적 대사 질환을 건조 혈액 여지를 사용해서 진단을 내리는 방법을 소개하였다^{7,8)}. 혈액 여지에 의한 분석은 전혈 검체를 이용한 방법보다 저렴한 비용, 편리한 운반, 적은 양의 혈액을 필요한 신생아들을 대상으로

할 수 있는 장점이 있다. 또한, 특수 장비가 필요 없어 잠재되어 있는 환자를 screening하는데 적용될 수 있다⁹⁾. 이 지속적인 연구 결과를 바탕으로 건조 혈액 여지를 이용한 검사가 환자 진단과 신생아 선별 검사에 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

References

- 1) Grabowski GA, Hopkin RJ. Enzyme therapy for lysosomal storage disease: principles, practice, and prospects. *Ann Rev Genomics Hum Genet* 2003;4:403-36.
- 2) Kaye EM. Lysosomal storage diseases. *Curr Treat Options Neurol* 2001;3:249-56.
- 3) Schiffmann R, Brady RO. New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs* 2002;62:733-42.
- 4) Li Y, Scott CR, Chamoles NA, Ghavami A, Pinto BM, Turecek F, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem* 2004;50: 1785-96.
- 5) Winke LP, Kamphoven JH, van den Hout JH, Severijnen LA, van Doorn PA, Reuser AJ, et al. Morphological changes in muscle tissue of patients with infantile Pompe's disease receiving enzyme replacement therapy. *Muscle Nerve* 2003;27:743-51.6) Worthman CM, Stallings JF. Measurement of gonadotropins in dried blood spots. *Clin Chem* 1994;40:448-53.
- 7) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Diagnosis of -L-iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem* 2001;47:780-1.
- 8) Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001;308:195-6.
- 9) Nesto A. Chamoles, Gabriela Niizawa, Mariana Blanco, Daniela Gaggioli, Carina Casentini. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clinica Chimica Acta* 2004;347:97-102.